

Montpellier Supagro,
Centre International d'études supérieures en sciences agronomiques

Effet assainissant de plantes de service contre le flétrissement bactérien de la tomate sur la parcelle de Rivière Lézarde (Martinique, saison 2)

Par Damien Richard

Promotion 2010, Stage de césure du 18 Octobre 2012 au 01 avril 2013



Parcelle expérimentale de Rivière Lézarde, Martinique

Tuteur Campus:

M. Jean-Jacques Kelner

Responsable de stage :

Mme. Péninna Deberdt

Mail : peninna.deberdt@cirad.fr

Liste des figures et tableaux

<i>Figure n°1: Plante de tomate saine (à droite) et plante atteinte de flétrissement bactérien (à gauche), (photo personnelle).</i>	<i>2</i>
<i>Figure n°2: Processus mobilisables lors de la mise en place d'une rotation culturale intégrant des plantes à potentiel assainissant (Ratnadass et al, 2011).</i>	<i>5</i>
<i>Figure n°3: Plantes de service utilisées et les différents traitements (station expérimentale de Rivière Lézarde)</i>	<i>9</i>
<i>Figure n°4: Plan expérimental de l'essai au champ à Rivière Lézarde</i>	<i>10</i>
<i>Figure n°5: Répartition des plants de tomates sur une unité parcellaire de la parcelle expérimentale (station de Rivière Lézarde).</i>	<i>11</i>
<i>Figure n°6: jardinières garnies des bioindicateurs tomates (photo personnelle).</i>	<i>12</i>
<i>Tableau n°1: indices de maladie des témoins tomate au champ</i>	<i>14</i>
<i>Figure n°7: script "R" de l'ANOVA qui étudie les indices de maladie des témoins tomate.</i>	<i>14</i>
<i>Figure n°8 : Indice de colonisation des bioindicateurs tomates à JAT 31, après la période de croissance des plantes de service (expérimentation en serre).</i>	<i>15</i>
<i>Figure n°9: script "R" de l'ANOVA qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 31.</i>	<i>15</i>
<i>Figure n°10: Cinétiques de flétrissement bactérien des bioindicateurs tomate jusqu'à JAT 51, au champ.</i>	<i>17</i>
<i>Figure n°11: Indices de flétrissement bactérien des bioindicateurs tomate à JAT 37.</i>	<i>18</i>
<i>Figure n° 12 : script et résultat de l'ANOVA qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 37.</i>	<i>18</i>
<i>Figure n° 13 : script et résultat de l'ANOVA qui étudie l'effet bâchage des indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 37</i>	<i>19</i>
<i>Figure n° 14 : script et résultat de l'ANOVA qui étudie l'effet bâchage des indices de colonisation des bio-indicateurs tomate à JAT 37</i>	<i>19</i>
<i>Figure n°15: graphique de flétrissement des bioindicateurs tomate à JAT 48</i>	<i>20</i>
<i>Figure n°16: script et résultat de l'anova qui étudie l'effet bloc sur les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 48.</i>	<i>21</i>
<i>Figure n°17: résultat du test de Tukey effectué sur les indices de colonisation des bio-indicateurs tomate à JAT 48.</i>	<i>21</i>

<i>Figure n°18: script et résultat de l'ANOVA qui étudie l'effet bâche sur les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 48</i>	<i>22</i>
<i>Figure n°19: matière fraîche produite par les différentes plantes de service après leur phase culturale</i>	<i>23</i>
<i>Figure n° 20 : script et résultat de l'anova qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 31</i>	<i>24</i>
<i>Figure n° 21 : groupes d'appartenance en fonction du test de Tukey effectué sur les analyses de FDA.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure n° 22 : script et résultat de l'ANOVA qui étudie les résultats de l'analyse de l'activité de la B-glucosidase.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure n° 23 : script et résultat de l'anova qui étudie les résultats de l'analyse de l'activité de l'Arylsulfatase.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure n° 24 : script et résultat de l'anova qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 31</i>	<i>26</i>
<i>Figure n° 25 : script et résultat de l'anova qui étudie l'activité de la FDA après la phase de croissance des plantes de service</i>	<i>27</i>
<i>Figure n° 26 : script et résultat de l'anova qui étudie l'activité de la B-Glucosidase après la phase de croissance des plantes de service</i>	<i>27</i>
<i>Figure n° 27 : graphique présentant les groupes d'appartenance en fonction des activités en B-glucosidase mesurées</i>	<i>28</i>
<i>Figure n° 28 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la chitinase</i>	<i>28</i>
<i>Figure n° 29 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la FDA.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure n° 30 : graphique présentant les groupes d'appartenance en fonction des activités en FDA mesurées</i>	<i>29</i>
<i>Figure n° 31 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la B-glucosidase</i>	<i>30</i>
<i>Figure n° 32 : graphique présentant les groupes d'appartenance en fonction des activités en B-glucosidase mesurées</i>	<i>30</i>
<i>Figure n° 33 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la chitinase</i>	<i>31</i>
<i>Figure n° 34 : groupes d'appartenance suite aux tests de Tukey effectués sur les activités enzymatiques, à lire par colonne et par dates.</i>	<i>32</i>

Glossaire

Plante de service: une plante de service se définit par une espèce cultivée dans la même parcelle que la culture de rente, et qui peut rendre différents services dont la protection contre les maladies ou ravageurs.

Adventices: une adventice désigne, pour les agriculteurs et les jardiniers, une plante qui pousse dans un endroit où l'on ne souhaite pas la voir se développer (champs, massifs...) car elle risquerait d'entrer en concurrence avec les plantes cultivées.

Gram négatif (bactérie): les bactéries Gram négatif ont une structure bimembranée, à l'opposition des bactéries gram positif qui ont une structure unimembranée.

Flagelle (d'une bactérie): le flagelle est génériquement une structure assurant la mobilité d'une cellule.

Xylème: il permet la circulation de la sève brute constituée d'eau et de sels minéraux puisés dans le sol par les racines.

Heatmaster: variété commerciale de tomate utilisée par les agriculteurs en Martinique

Allélopathie: l'allélopathie est l'ensemble de plusieurs interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre (micro-organismes inclus) au moyen de métabolites secondaires tels les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les alcaloïdes.

Exsudats racinaires: liquide excrété par les racines des végétaux.

Pyrrolizidine: la pyrrolizidine est un composé organique hétérocyclique, formé schématiquement de deux cycles pyrroles accolés. C'est la forme hydrogénée de la pyrrolizine. C'est aussi la structure centrale d'une classe d'alcaloïdes nommée alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Nodulation: la nodulation correspond à la capacité qu'ont certaines plantes à former des nodosités au niveau racinaire, qui hébergent une bactérie fixatrice d'azote du genre *Rhizobium*.

Ces nodosités vont représenter de véritables organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes.

Molécule biocide: une molécule biocide est une substance exerçant une action générale ou spécifique contre des organismes nuisibles.

Suppressivité du sol: barrière naturelle qui bloque l'expression d'une maladie.

Catalyseurs: molécule qui accélère la vitesse d'une réaction et qui revient à sa forme initiale à la fin de la réaction. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques.

Bioindicateur: un bioindicateur est un indicateur biologique qui renseigne sur certaines caractéristiques écologiques de l'environnement, ou sur l'impact de certaines pratiques agricoles. Dans notre cas, le bioindicateur est la tomate et permettra de quantifier le potentiel infectieux du sol en *R. solanacearum*..

Sommaire

Introduction.....	1
I/ Revue de littérature	2
La problématique du flétrissement bactérien chez la tomate.....	2
Gestion de la santé des sols.....	4
Des plantes au service de la qualité du sol	5
Utilisation en phase de mulch.....	7
Des indicateurs liés à la qualité des sols: les enzymes.....	7
II/ Matériel.....	9
III/ Méthode	10
A/ Essai au champ.....	10
B/ En serre	12
C/ Analyses de laboratoire.....	13
IV/ Résultats.....	14
A/ Potentiel infectieux du sol	14
1/ Avant la période de croissance des plantes de service (au champ)	14
2/ Après la période de croissance des plantes de service (en serre)	15
3/ Après la phase de mulch des plantes de service (au champ)	17
D/ Production de biomasse par les plantes de service et teneur en azote minéral du sol.....	23
F/ L'Etat biologique du sol via l'analyse des activités enzymatiques	24
1/ Avant la période de croissance des plantes de service	24
2/ Après la phase de croissance des plantes de service.....	27
3/ Après la phase de croissance des plantes de service.....	29
III/ Interprétation	33
A/ Effet suppressif des plantes de service sur le flétrissement bactérien de la tomate	33
B/ Impact du bâchage et effet des plantes de service.....	35
Conclusions et perspectives.....	37
Bibliographie	38
ANNEXES	40

Introduction

Ce rapport présente le projet d'étude auquel j'ai participé dans le cadre de mon stage de césure réalisé au Campus agro-environnemental Caraïbe. Ce projet, débuté en 2011, vise à étudier l'effet assainissant de plantes appelées "**plantes de service** ^a " contre le flétrissement bactérien de la tomate causé par la bactérie tellurique *Ralstonia solanacearum*.

Cette bactérie diminue fortement la production en tomates des parcelles infestées. Son contrôle représente donc un enjeu important pour les agriculteurs en maraîchage, en Martinique.

Ce rapport détaille les effets de la mise en place d'une rotation culturale introduisant des plantes de services sur la qualité sanitaire du sol, en rapport avec le niveau de contamination du sol par *Ralstonia solanacearum* mais pas seulement ; En effet, ce projet donne également toute son importance aux populations microbiennes du sol, avec l'analyse d'activités enzymatiques qui nous renseignent sur l'état biologique du sol qu'il est important d'étudier parallèlement. Les résultats d'un essai au champ, sur la parcelle expérimentale de Rivière Lézarde, seront présentés mais aussi les résultats d'un essai réalisé en conditions contrôlées, ainsi que des analyses biochimiques du sol de la parcelle d'étude.

L'objectif de cette campagne 2012/2013 est de valider les résultats obtenus l'année précédente, (campagne 2011/2012). La partie discussion de ce rapport comprend donc une comparaison des résultats des deux campagnes successives.

^a On trouvera les définitions des termes techniques et des sigles en gras dans le glossaire qui figure en tête du rapport.

I/ Revue de littérature

La problématique du flétrissement bactérien chez la tomate

La Martinique a une production maraîchère faible: de 6000 tonnes en 2003 à 4000 tonnes en 2004, la production de tomates a très vite chuté à cause du flétrissement bactérien causé par la bactérie tellurique *Ralstonia solanacearum*, responsable de pertes allant jusqu'à 100% en plein champ (Agriculture.gouv.fr, 2011^[1]).

Les parcelles infestées par *R. solanacearum* sont impropres à la culture de la tomate car la bactérie survit dans le sol ou sur les fragments végétaux et garde donc sa capacité infectieuse pour les cultures sensibles de tomates.

La présence de *R. solanacearum* en Martinique pose problème car elle est très présente dans les sols et est pathogène des tomates ainsi que d'autres solanacées comme le piment, et des cucurbitacées comme le concombre ou la pastèque. Les **adventices** présentes sur les parcelles comprennent également des plantes hôtes non sensibles (c'est à dire qu'elles hébergent la bactérie mais n'expriment pas de symptômes) comme le pourpier, présent sur le site de l'étude, et qui permettent à la bactérie de survivre dans le sol d'une parcelle même en l'absence de culture.

R. solanacearum est une bactérie **gram négatif** avec **flagelle**. La bactérie pénètre dans la plante par une lésion au niveau des racines, se propage dans les tissus végétaux, colonise le **xylème**, et infeste toute la plante, provoquant le flétrissement bactérien visible en **Figure n° 1**.

La première cause de flétrissement est le blocage des vaisseaux du xylème par les bactéries. Sur les tomates, les symptômes de la maladie sont facilement identifiables: les plus jeunes feuilles sont touchées en premier et deviennent flasques. Généralement la tige produit de nombreuses racines adventives. Les tissus vasculaires prennent une couleur brune, et une coupe transversale des tiges laisse apparaître un exsudat blanc laiteux.



Figure n°1: Plante de tomate saine (à droite) et plante atteinte de flétrissement bactérien (à gauche), (photo personnelle).

La sélection variétale pourrait aider à se prémunir des effets néfastes de *R. solanacearum*; cependant sa grande variabilité et plasticité génotypique lui permettent de contourner rapidement la résistance génétique. Ainsi, aucune résistance génétique universelle n'existe pas chez la tomate (Lebeau, 2010 ^[2]). La variété **Heatmaster**, très utilisée en Martinique, possède une résistance partielle, qui a semble t-il été contournée par la population émergente de *R. solanacearum* en Martinique.

Le control de ce parasite tellurique par des plantes de service n'a encore fait l'objet que d'un petit nombre d'études, mais les résultats montrent que la technique fonctionne. Ainsi, Paula Fernandez, Péninna Debert *et al.* (2012) ^[3]) ont obtenus une réduction de l'incidence de la maladie de 73 à 89% en introduisant des plantes de service en rotation culturale dans les systèmes de culture de la tomate. L'application au sol *in vitro* et avant culture de la tomate d'extraits aqueux d'*Allium fistulosum*, appelé oignon pays en Martinique, a également induit une importante réduction de l'incidence de la maladie (Deberdt *et al.* 2012 ^[4]). Les plantes traitées avec cet extrait végétal naturel ont eu un taux de flétrissement bactérien d'environ 15%, contre 50% pour les témoins sans extrait.

Gestion de la santé des sols

Charles Darwin, considéré comme le grand précurseur de l'écologie du sol, a écrit en 1881 un ouvrage traitant des sols comme support de vie et produit de la vie. Dans cet ouvrage, il commence à souligner l'importance des interactions entre êtres vivants du sol.

L'importance de l'étude de ces interactions n'a pas été surestimée par Darwin, puisque de nos jours de nombreux centres de recherche s'y réfèrent. L'INRA a par exemple inauguré le 6 juillet 2012 une plateforme de phénotypage haut débit hébergée sur le site de l'INRA de Dijon, qui a été conçue pour caractériser les interactions entre les plantes et les microorganismes du sol. Jusqu'à aujourd'hui, le contrôle de *R. solanacearum* par les pesticides ne s'est pas montré très efficace et a provoqué des impacts négatifs sur l'environnement (Wu *et al.*, 2012 ^[6]).

Dans leur étude, Lwin and Ranamukhaarachchi, 2006 ^[7] ont montré l'importance des populations bactériennes antagonistes (l'auteur a utilisé des populations bactériennes issues d'extraits végétaux fermentés) au *R. solanacearum* dans la gestion du flétrissement bactérien. Leur expérience *in vivo* a montré que les niveaux d'infestation des différents traitements sont toujours significativement plus bas que le contrôle avec le pathogène seul, que l'introduction des populations bactériennes antagonistes dans les pots de culture soit faite avant, en même temps, ou après le pathogène ^[7].

La définition de l'**allélopathie** la plus commune fait référence aux interactions biochimiques entre plantes, micro-organismes inclus, mais cette définition est parfois plus restrictive et ne concerne alors donc plus que les interactions entre plantes. Quoi qu'il en soit Charles *et al.* précisent en 2012 ^[7] que ce processus vise à valoriser un couvert végétal en montrant que des substances allélochimiques produites par ce couvert végétal sont libérées dans le sol par lessivage ou *via* les **exsudats racinaires** et peuvent exprimer un effet suppressif sur des bioagresseurs telluriques. Ils précisent également l'effet assainissant de ce couvert végétal (genre *Crotalaria* ou *Tagetes patula*) sur des populations de nématodes.

Des plantes au service de la qualité du sol

Le développement des populations de microorganismes bénéfiques du sol peut être favorisé par certaines espèces végétales introduites dans les systèmes de culture en rotation culturale pour contrôler les parasites telluriques.

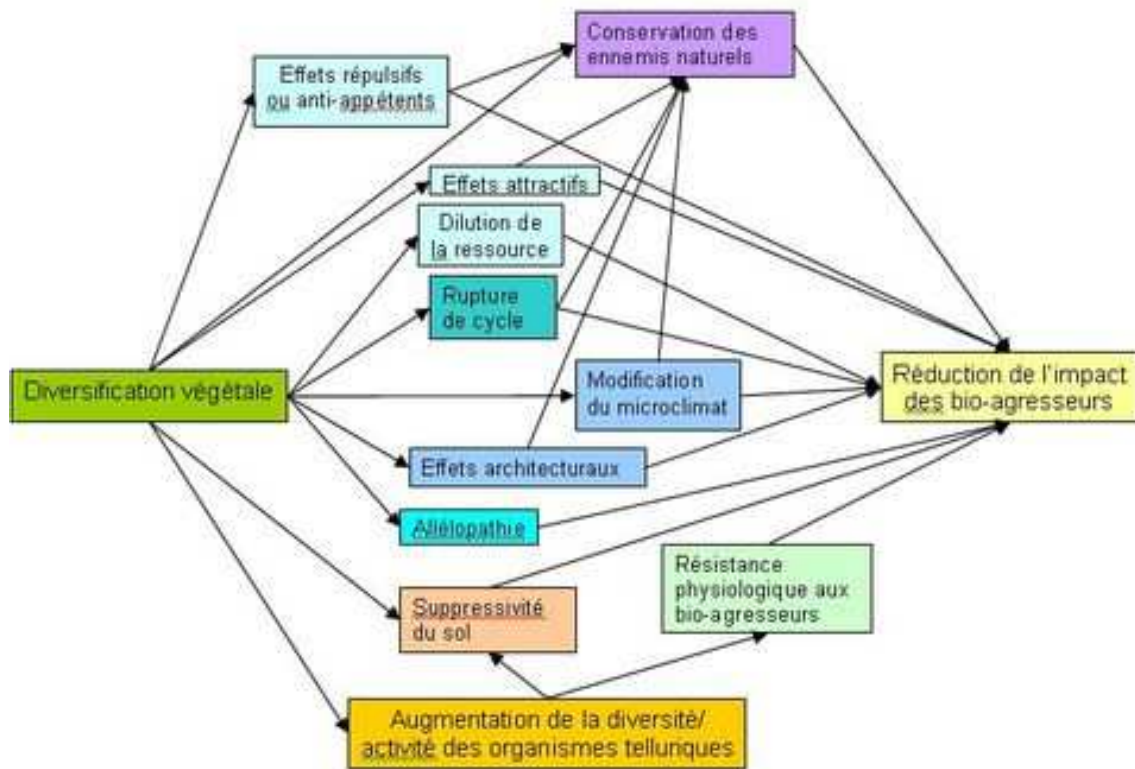


Figure n°2: Processus mobilisables lors de la mise en place d'une rotation culturale intégrant des plantes à potentiel assainissant (Ratnadass *et al*, 2011).

Comme le montre la **Figure n° 2**, la diversification végétale apportée par la mise en place d'une rotation avec des espèces à potentiel assainissant permet de limiter l'impact des bioagresseurs telluriques sur une culture, *via* différents processus.

L'introduction des plantes de service agit de façon directe en interrompant par exemple le cycle de vie du pathogène, mais aussi de façon indirecte en favorisant par exemple la diversité et l'activité des microorganismes telluriques.

Mucuna deeringiana (famille des Fabacées) a des effets à différents niveaux sur la microflore du sol: il agit de manière directe avec un effet biocide sur les nématodes (qui n'est pas négligeable dans ce projet puisque les nématodes causent des blessures au niveau des racines des tomates, qui constituent un point d'entrée pour la bactérie tellurique *R. solanacearum*) (Quaranta, 2009^[8]). La rhizosphère de *M. deeringiana* serait également propice au développement de diverses bactéries antagonistes aux nématodes, agissant donc de manière indirecte. Le *Mucuna* présente également un effet "plante piège" c'est-à-dire que les nématodes infestent les racines mais ne peuvent pas s'y développer à cause des substances biocides produites par la plante.

Vigna unguiculata est une plante appartenant à la famille des Fabacées qui possède la faculté de nuire au développement de plusieurs types de ravageurs : des nématodes, des foreurs de tiges ainsi que la bactérie *R. solanacearum* (Quaranta, 2009^[8]).

Crotalaria juncea et *Crotalaria spectabilis*, appartenant à la famille des Fabacées, possèdent elles aussi un caractère " répulsif " et " plante piège " contre les nématodes. La **pyrrolizidine**, dégagée lors de la décomposition de la plante, agirait directement sur le développement des larves de nématodes et en inhiberait également l'éclosion des oeufs^[8].

Allium fistulosum, de la famille des Alliacees, est à la fois non-hôte de *R. solanacearum* (communication personnelle Peninna Deberdt, 2013) et réprime l'expression de la maladie, tout en faisant décroître la densité de l'inoculum de *R. solanacearum* dans le sol grâce à l'émission racinaire de thiosulfates (Fernandez *et al.*, 2012^[3]).

A l'exception d'*Allium fistulosum*, les plantes citées précédemment appartiennent à la famille des Fabacées. La majorité d'entre elles a donc la propriété de **noduler**, propriété importante du point de vue agronomique. En effet, les nodules racinaires des plantes de cette famille contiennent une bactérie du genre *Rhizobium* qui favorise la nutrition azotée de la plante, augmentant également le taux d'azote du sol, et ainsi donc la robustesse des plantes ce qui les rend plus résistantes face aux maladies. Dans tous les cas, favoriser une présence biologique autour des racines des plantes est toujours un bon moyen de régulation des pathogènes telluriques, car les microorganismes bénéfiques exercent une compétition avec les bioagresseurs.

Utilisation en phase de mulch

La technique du mulch correspond à une biodésinfection du sol. Elle fait appel aux propriétés biochimiques de certaines plantes, qui limitent l'impact des pathogènes telluriques, mais permet également d'améliorer la teneur en matières organiques du sol. Dans leur rapport de 2000, Villeneuve et Lepaumier ^[9] rapportent une diminution des problèmes phytosanitaires dus au champignon tellurique *Sclerotinia minor* (présent dans les quelques premiers centimètres du sol) en incorporant une période de mulch bâché dans une culture de salades.

Les modes d'action sont multiples: augmentation de la compétition entre microorganismes et agents pathogènes, en particulier pour les oligo-éléments et l'oxygène (pour le cas d'un mulch bâché), pénétration dans le sol des **molécules biocides** contenues dans les plantes de service ou de leurs sous-produits.

Des indicateurs liés à la qualité des sols: les enzymes

Catalyseurs biologiques des réactions microbiennes dans le sol, les enzymes sont de bons indicateurs de contrôle de la libération des nutriments pour la croissance des plantes et des microorganismes. L'activité des enzymes est étroitement associée à l'activité de la biomasse microbienne, qui est l'indicateur le plus relié au concept de qualité d'un sol.

L'activité des enzymes est très influencée par les propriétés physico-chimiques des sols tels que le pH, l'humidité, le taux de MO, mais aussi par le mode de gestion culturale du sol, ce qui rend leur étude pertinente dans notre cas.

FDA - Hydrolyse de la fluorescéine diacétate -

La mesure de l'hydrolyse du FDA présente l'avantage de concerner plusieurs groupes d'enzymes différentes, le diacétate de fluorescéine étant en effet hydrolysé par des lipases, des protéases, ou encore des estérases. Cette activité enzymatique est d'une aide précieuse pour la caractérisation de l'état biologique d'un sol car elle mesure de façon globale l'activité enzymatique microbienne du sol.

L'activité de cette enzyme est corrélée positivement avec la respiration microbienne et le carbone total du sol (Com. Personnelle Asensio ^[11]). Elle reflète également la **suppressivité des sols**.

Chitinase

La chitinase est une enzyme catalysant la dégradation de la chitine, présent dans les

actinomycètes et les arthropodes. Miesel I. ^[12] ont utilisé en 2010 l'activité de cette enzyme comme indicateur de l'activité microbienne du sol. La chitinase joue un rôle important dans le cycle du carbone et dans celui de l'azote (Asensio, 2013 ^[11]). Une haute activité de la chitinase est associée à une résistance aux nématodes à galles.

B-Glucosidase

L'activité de la B-Glucosidase, qui est la glycosidase prédominante dans le sol (Acosta-Martinez *et al.*, 2006 ^[13]), est impliquée dans la dernière étape de la dégradation de la cellulose (en glucose), et est de ce fait importante dans le cycle du carbone. Cette enzyme, qui procure des sources d'énergie et de substrat pour les organismes hétérotrophes, a une activité corrélée avec la biomasse microbienne du sol. Elle est souvent étudiée dans le cadre de l'évaluation de la qualité et de la santé des sols, et son étude renseigne principalement sur l'intensité de l'activité des microorganismes du sol intervenant dans la dégradation de la matière organique ^[10].

Arylsulfatase

L'arylsulfatase est le catalyseur de la réaction d'hydrolyse des esters sulfates organiques en sulfates. Elle joue un rôle important dans le cycle du soufre. Cette enzyme est produite par les plantes mais aussi par les microorganismes du sol, et son activité est corrélée positivement avec la biomasse microbienne ^[10].

II/ Matériel

Le **bioindicateur** utilisé pour évaluer l'expression de la maladie est la variété de tomate "Heatmaster" au champ, et la variété "Roma" en serre ; cette dernière est plus sensible à la maladie.

Les 5 plantes de service utilisées pour les différents traitements (voir **figure n°4**) appartiennent à deux familles botaniques. Ces plantes ont été choisies pour leurs propriétés biocides précédemment évoquées, et ont déjà été testées en 2011 sur la même parcelle expérimentale.

* 4 Fabacées : *Mucuna deeringiana* "Singapour", *Crotalaria juncea* cv.IAC-1, *Crotalaria spectabilis* et *Vigna unguiculata* cv. 'Ebony'

* 1 Alliacee: *Allium fistulosum*

Plante	MULCH seul	MULCH + BACHAGE
<i>Mucuna deeringiana</i>	T1	T2
<i>Crotalaria juncea</i>	T3	T4
<i>Crotalaria spectabilis</i>	T5	T6
<i>Allium fistulosum</i>	T7	T8
<i>Vigna unguiculata</i>	T9	T10
Sol nu	T11	T12
Tomate	T13	T14

Figure n°3: Plantes de service utilisées et les différents traitements (station expérimentale de Rivière Lézarde)

Le sol destiné aux analyses de laboratoire (effectuées avant et après la période de croissance des plantes de service, ainsi qu'après la phase de mulch des plantes de service) est prélevé à la tarière de 0 à 10 cm de profondeur, en prenant soin d'effectuer cinq prélèvements sur chaque unité parcellaire pour garantir l'homogénéité du prélèvement. Avant analyse, le sol sera également tamisé, pour garantir un bon mélange des 5 prélèvements.

L'évaluation de l'intensité de la maladie après la phase de croissance des plantes de service ne pouvant pas être effectuée au champ du fait la réalisation de la phase de mulch, celle-ci est mesurée en serre après transfert du sol en jardinières.

Le sol destiné à l'évaluation de l'intensité de l'inoculum de *R. solanacearum* en serre est également prélevé de 0 à 10 cm, avec 5 prélèvements, mais ils sont cette fois effectués à la bêche compte tenu du volume nécessaire au remplissage d'une jardinière.

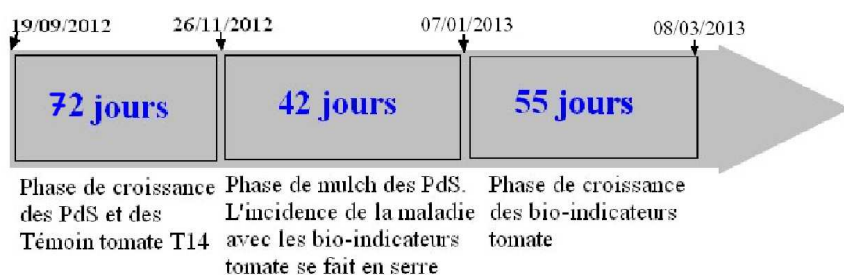
III/ Méthode

A/ Essai au champ

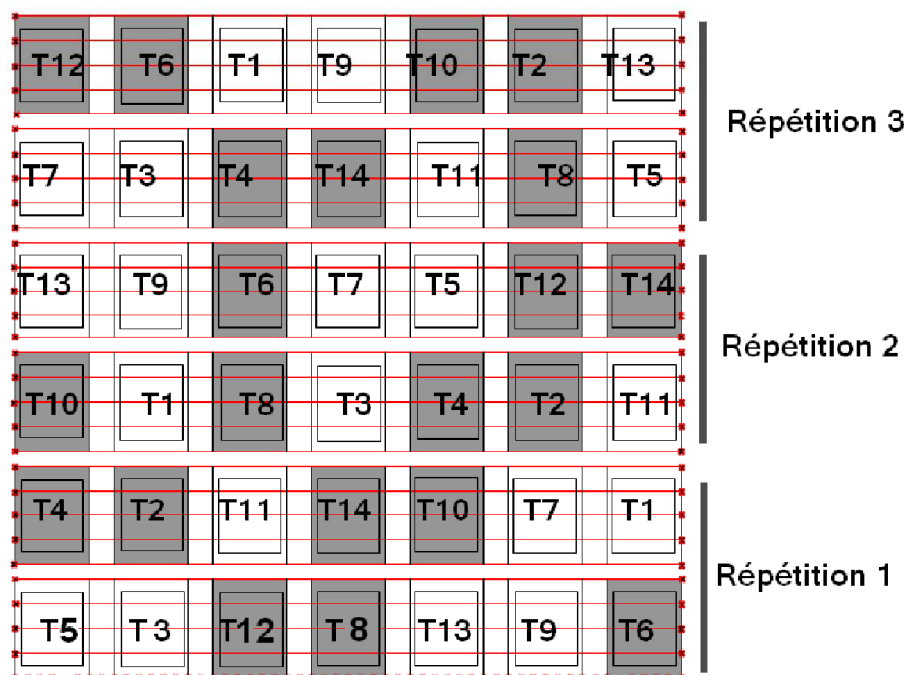
Sur le site expérimental de rivière Lézarde, l'effet assainissant de cinq plantes de service à cycle long (70 jours) est testé. Ces plantes ont été choisies pour leurs effets biocides précédemment démontrés en conditions semi-contrôlées de serre ; elles ont également déjà été testées au champ lors d'une précédente étude sur la même parcelle, au cours de la campagne 2011/2012.

L'essai comporte trois phases:

- La phase de croissance des plantes de service (du 19 Septembre au 26 Novembre 2012)
- La phase de mulch des plantes de service (du 27 Novembre au 7 janvier 2013)



- La phase de croissance des tomates (du 8 Janvier 2013 au 8 mars 2013)



Le dispositif expérimental présenté en **Figure n°3** est mis en place sur une parcelle (parcelle de Rivière Lézarde). La parcelle est divisée en 42 unités parcellaires ; 7 traitements sont représentés. Chaque traitement comporte une modalité bâchée durant la phase de mulch et une modalité non-bâchée. Chaque combinaison traitement x modalité « bachage » est répétée 3 fois.

Figure n°4: Plan expérimental de l'essai au champ à Rivière Lézarde

Evaluation de l'intensité de la maladie

Au début de la phase de croissance des plantes de service, l'intensité de la maladie est mesurée à l'aide du bioindicateur tomate (variété Heatmaster) dans les traitements T13 et T14.

Au début de la phase de mulch, l'intensité de la maladie est mesurée en serre, puisqu'aucune plante ne peut être cultivée sur les unités parcellaires, au champ.

Après la phase de mulch, l'intensité de la maladie est mesurée au champ. 35 plants « bioindicateur tomate » sont plantés sur chaque unité parcellaire du champ

expérimental, comme le montre la **Figure n° 5**. Seules 15 plantes seront utilisées pour suivre le développement de la maladie, les autres ne servant que de bordure, pour séparer les traitements les uns des autres.

Le suivi est effectué deux fois par semaine: le nombre de plantes flétries est enregistré dans chaque unité parcellaire.

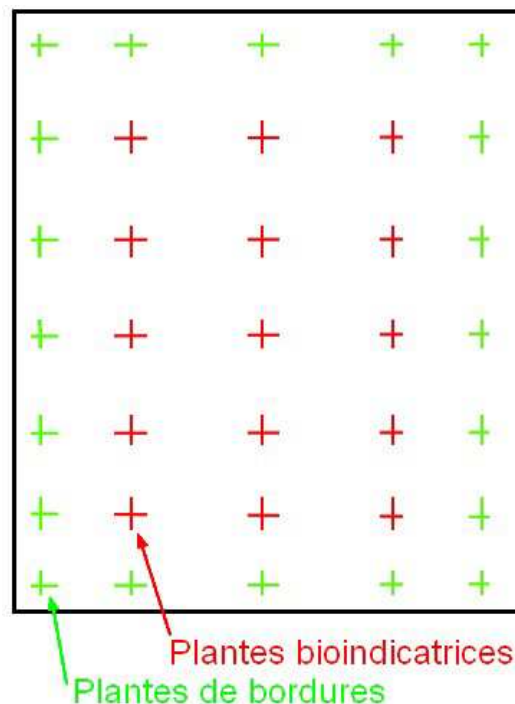


Figure n°5: Répartition des plants de tomates sur une unité parcellaire de la parcelle expérimentale (station de Rivière Lézarde)

B/ En serre

Avant la phase de mulch, les prélèvements de terre des modalités bâchées et non-bâchées des mêmes traitements sont mélangés deux par deux car ils ne diffèrent pas (ils ne diffèrent que par la modalité bâchage, donc seulement après la phase de mulch).

Le sol de chaque traitement est transféré dans des jardinières de 60 cm de long. Les « bioindicateurs tomate » sont plantés dans les jardinières, à raison

de 12 plants de tomate par jardinière comme le montre la **Figure n° 6**. Les tomates servent de bioindicateurs du potentiel infectieux du sol en *R. solanacearum*. Le nombre de plants de tomates flétris est noté trois fois par semaine durant 31 jours.

En fin d'expérimentation les plants non flétris sont isolés afin de déterminer les infections latentes.



Figure n°6: jardinières garnies des bioindicateurs tomates (photo personnelle).

C/ Analyses de laboratoire

Les prélèvements de sol effectués sur chaque unité parcellaire du champ expérimental de Rivière Lézarde avant et après la période de croissance des plantes de service, ainsi qu'après la phase de mulch des plantes de service sont soumis à l'analyse de l'activité de 4 enzymes ainsi que de la teneur en azote minéral.

Analyse de 4 activités enzymatiques

*Analyse de l'activité de la FDA (Hydrolyse de la fluorescéine diacétate)

*Analyse de l'activité de la chitinase

*Analyse de l'activité de l'Arylsulfatase

*Analyse de l'activité de la B-glucosidase

Pour ces quatre enzymes, le schéma de protocole est globalement le même et suit les étapes suivantes:

-Pesée des échantillons: pour chaque numéro de traitement, trois échantillons sont prélevés, et un témoin réalisé. On pèse 1g de sol frais par tube Falcon, sauf pour la FDA pour laquelle on pèse 0,50 g. Les pesées peuvent se faire la veille de l'analyse. Un blanc par série est également réalisé.

-Ajout d'un substrat et mise à incubation. Les échantillons sont mélangés via un agitateur après ajout du substrat, et placés dans l'incubateur à 37°C pendant une durée spécifiée (1h pour la B-glucosidase et l'Arylsulfatase, 3h pour la FDA et 2h pour la chitinase).

-Après incubation, la réaction est arrêtée, et l'on mesure (après filtration et centrifugation éventuelles) l'absorbance dans des micro-cuves spectrophotométriques. Il faut avoir au préalable réalisé les mesures d'absorbance de la gamme étalon du jour. Les résultats sont exportés directement sur mémoire flash au format .csv.

Analyse de la teneur en azote minéral du sol (NH₄ et NO₃)

Après avoir réalisé l'extraction au KCl 1M, les échantillons sont envoyés pour dosage au laboratoire de pédologie du PRAM via un analyseur automatique. On récupère ensuite les données de teneur en NH₄ et NO₃ pour chacun des échantillons.

Mesure de la matière fraîche produite par les plantes de service

Après leur phase de croissance, les plantes de service ont été coupées au niveau du collet et pesées. Une portion de matière fraîche de chaque plante de service est prélevée pour obtenir le ratio matière sèche/matière fraîche et calculer ainsi leur rendement en matière fraîche et sèche.

IV/ Résultats

A/ Potentiel infectieux du sol

1/ Avant la période de croissance des plantes de service (au champ)

Les indices de flétrissement bactérien des témoins tomate T13 et T14, avant la croissance des plantes de service, sont présentés dans le

Tableau n°1.

Tableau n°1: indices de maladie des témoins tomate au champ

Témoin tomate plein champ (T13/T14)		
JAT:	37	
Traitement	Bloc	Indice de flétrissement
T13	1	0,8
T14	1	0,8
T13	2	0,87
T14	2	0,73
T13	3	0,8
T14	3	1

```
tableau <- read.csv("indcold1.csv", header = FALSE,
tableau
attach(tableau)

summary(tableau)

at <- aov(arcsin~bloc+traitement)
summary(at)
shapiro.test(residuals(at))

> at <- aov(arcsin~bloc+traitement)
> summary(at)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
bloc           1  0.00225  0.00225    0.025  0.885
traitement     1  0.00114  0.00114    0.013  0.918
Residuals      3  0.27314  0.09105
> shapiro.test(residuals(at))

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(at)
W = 0.8568, p-value = 0.1783
```

Figure n°7: script "R" de l'ANOVA qui étudie les indices de maladie des témoins tomate.

La **Figure n°7** présente le script "R" utilisé pour déterminer si les moyennes des échantillons sont significativement différentes ou non. Avant d'être traitées, les données sont normalisées par la fonction "Arc-Sinus de la racine carré", ceci est valable pour toutes les analyses statistiques opérées sur des indices de flétrissement.

Le test de Shapiro sert à vérifier la normale distribution des résidus de l'ANOVA. Ce test rapporte une p-value supérieure au seuil 0.05, ce qui ne rejette pas l'hypothèse H_0 de normale distribution des résidus au risque 5% ; nous pouvons donc effectuer une ANOVA. Le résultat de l'ANOVA rapporte une p-value de 0.885 en fonction du facteur "bloc", ce qui montre qu'il n'y a pas d'effet du bloc sur les résultats. Il rapporte également une p-value de 0.918 en fonction du facteur "traitement", ce qui montre que les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes. Nous commençons donc la campagne 2012/2013 de Rivière

Lézarde avec une incidence de maladie uniformément distribuée sur la parcelle. Il est également à noter que le potentiel infectieux du sol est très élevé au début de l'expérience (avant la phase de croissance des plantes de service), puisqu'on enregistre un taux moyen de flétrissement bactérien de 83%.

2/ Après la période de croissance des plantes de service (en serre)

Il n'y a ici pas d'indice de flétrissement au champ car les unités parcellaires sont occupées par le mulch des plantes de service ; aucune plante n'est donc en croissance sur la parcelle au champ. Le bioindicateur tomate permet, en serre, de mesurer l'impact de la phase culturale des plantes de service sur le potentiel infectieux du sol en *R. solanacearum*. Les indices de flétrissement bactérien des bioindicateurs tomate sont présentés dans la **Figure n° 8**.

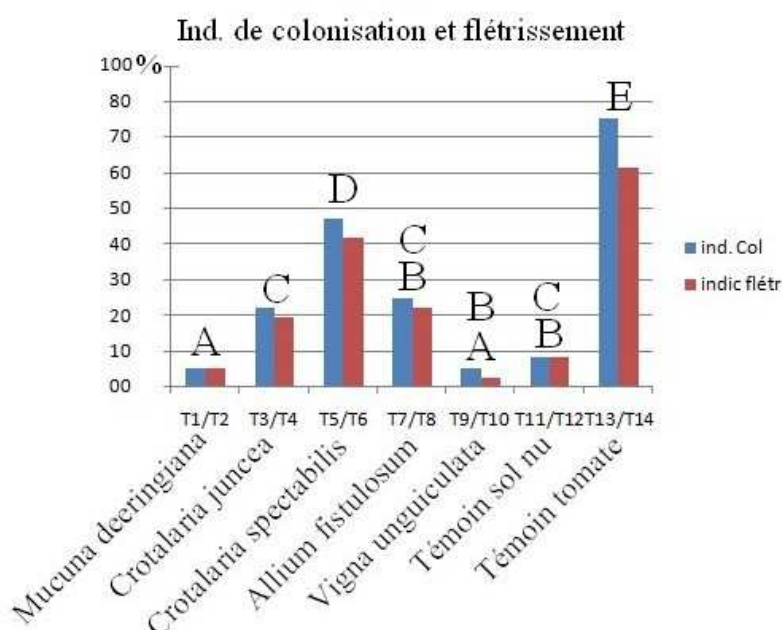


Figure n°8 : Indice de colonisation des bioindicateurs tomates à JAT 31, après la période de croissance des plantes de service (expérimentation en serre)

Après normalisation et vérification de la distribution normale des échantillons, le script de la **Figure n° 9**, nous indique tout d'abord qu'aucun effet bloc n'est présent.

```
> at <-aov(arcsin~facbloc*factraitement*facjat)
> summary(at)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq
facbloc	2	0.398	0.1992
factraitement	6	9.568	1.5946
facjat	11	3.354	0.3049
facbloc:factraitement	12	6.248	0.5207
facbloc:facjat	22	0.249	0.0113
factraitement:facjat	66	2.233	0.0338
facbloc:factraitement:facjat	132	2.338	0.0177

En effet, la p-value avec comme facteur le bloc est de 0.1992, donc supérieure au seuil de 0.05, les distributions sont donc égales.

Figure n°9: script "R" de l'ANOVA qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 31

En revanche, la p-value de l'analyse utilisant comme facteurs le traitement et le nombre de JAT (Jours Après Transplantation) est de 0.038, donc inférieure au seuil de 0.05 : nous pouvons donc considérer, au risque de 5%, que les distributions sont différentes.

Remarque: nous ne devons pas étudier la dernière ligne du script de la **Figure n°9** car elle utilise le bloc comme facteur, or nous voulions simplement tester que le bloc n'a pas d'effet, aucunement l'inclure dans l'étude car des traitements identiques provenant de blocs différents doivent être considérés comme des répétitions et non des échantillons différents.

Le test de Tukey étudie, sous hypothèse de normale distribution des échantillons, la significative différence ou non des échantillons deux à deux. Le résultat de ce test est visible en Annexe n°I et nous permet de créer des classes significativement différentes les unes des autres au sein des indices de colonisation présentés en **Figure n°8**. On remarque que tous les traitements sont significativement différents du témoin tomate (T13 et T14).

3/ Après la phase de mulch des plantes de service (au champ)

Au champ, le suivi de flétrissement bactérien des 15 bioindicateurs tomate permet d'obtenir les courbes de flétrissement présentées dans la **Figure n°10** selon que les traitements soient bâchés ou non durant la phase de mulch. Ces courbes de flétrissement nous permettent de choisir deux dates qui caractérisent au mieux l'expression de la maladie : 37 jours après transplantation des bioindicateurs (JAT37) et 48 jours après transplantation des bioindicateurs (JAT48). Le choix de la date JAT37 nous permettra de comparer les résultats avec ceux de la campagne 2011/2012 à JAT37 (Mathurin, 2012 ^[14]).

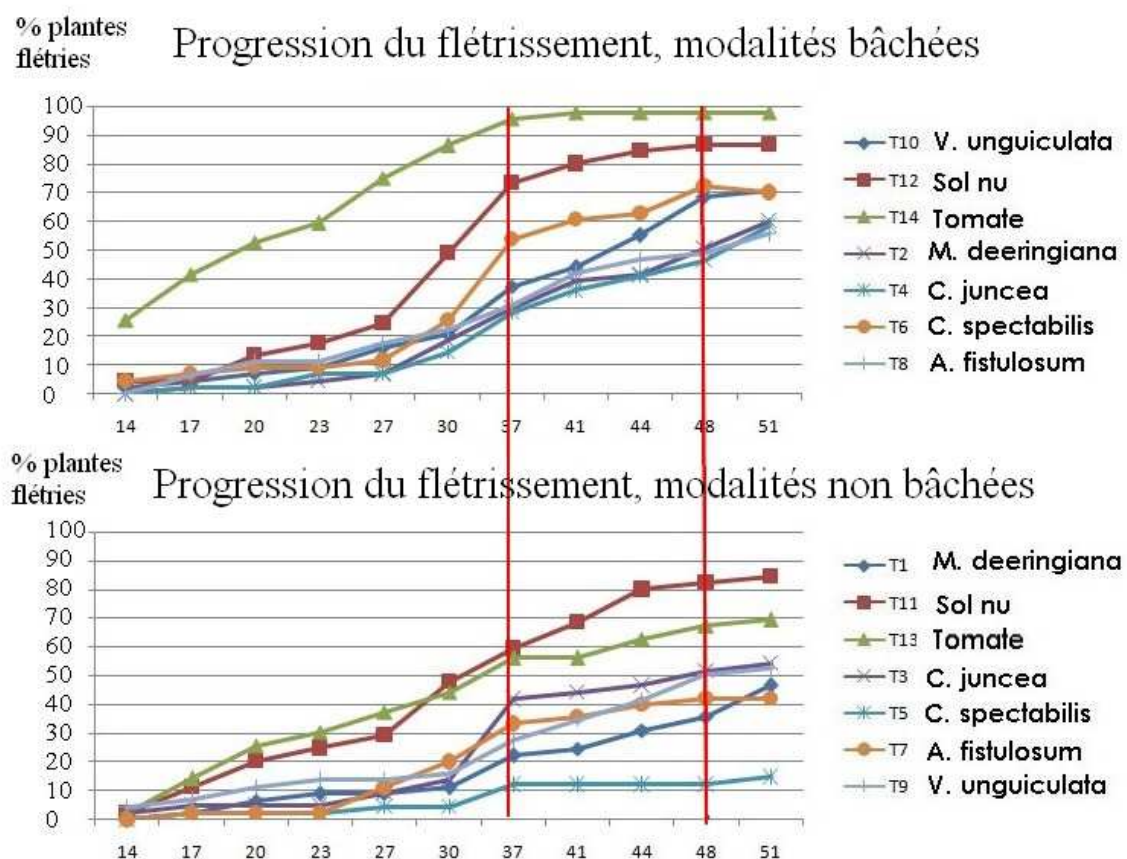


Figure n°10: Cinétiques de flétrissement bactérien des bioindicateurs tomate jusqu'à JAT 51, au champ

* Etude des indices de flétrissement à JAT 37

La **Figure n°11** montre les indices de maladie obtenus à JAT37 pour chaque traitement et chaque modalité de bâchage.

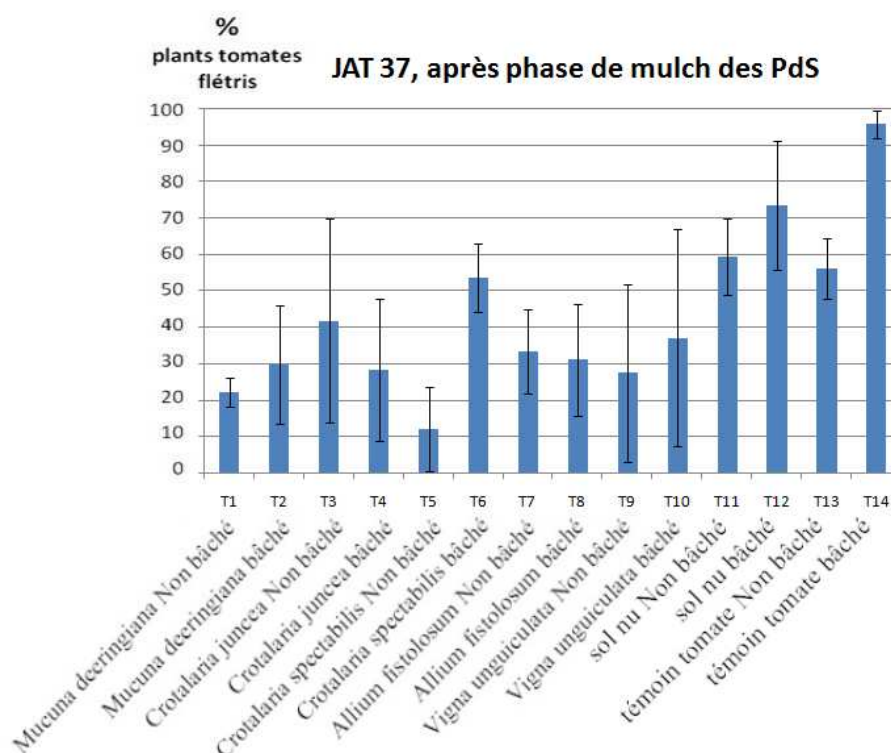


Figure n°11: Indices de flétrissement bactérien des bioindicateurs tomate à JAT 37

Comme précédemment, une analyse statistique des données a été effectuée avec "R".

```
> shapiro.test(residuals(aov(arcsin~factraitement)))

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(aov(arcsin ~ factraitement))
W = 0.9872, p-value = 0.914

>
> at <-aov(arcsin~bloc*factraitement)
> summary(at)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
bloc	1	0.1220	0.12201	3.275	0.091871 .
factraitement	13	3.0162	0.23201	6.227	0.000839 ***
bloc:factraitement	13	0.6651	0.05116	1.373	0.281539
Residuals	14	0.5216	0.03726		

Figure n° 12 : script et résultat de l'ANOVA qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 37

La **Figure n° 12** présente le résultat de l'ANOVA effectuée sur les indices de flétrissement des bioindicateurs tomate à JAT 37.

La p-value avec comme facteur le bloc est supérieure au seuil de 0.05, je considère donc que les distributions sont égales, au risque de 5%. Il n'y a donc pas d'effet bloc (les 3 répétitions des mêmes traitements ne sont pas significativement différentes) sur cette période.

La p-value avec comme facteur le traitement est inférieure au seuil de 0.05, je considère donc que les distributions ne sont pas égales, au risque de 5%. Il y a donc un effet des traitements à JAT 37.

```
> at <- aov(arcsin~facbache*factraitement)
> summary(at)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
facbache	1	0.3729	0.3729	7.979	0.008626 **
factraitement	6	2.0084	0.3347	7.162	0.000106 ***
facbache:factraitement	6	0.6349	0.1058	2.264	0.066080 .
Residuals	28	1.3087	0.0467		

Figure n° 13 : script et résultat de l'ANOVA qui étudie l'effet bâchage des indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 37

La p-value avec comme facteur le bâchage est inférieure au seuil de 0.05, je considère donc que les distributions ne sont pas égales, au risque de 5%. Il y a un effet du bâchage sur cette période.

Le test de Tukey présenté en **Figure n°14** indique que tous les traitements sont significativement différents du T14 sauf T13, T12, T11 et T6,

Le T5 est significativement différent du T12 et du T14.

Tukey HSD

traitement	p adj
T14-T1	0,0024553
T14-T10	0,0129767
T5-T12	0,0133554
T2-T14	0,0056319
T3-T14	0,0213157
T4-T14	0,0041917
T5-T14	0,0003293
T7-T14	0,0089883
T8-T14	0,0064956
T9-T14	0,0018737

Figure n° 14 : résultat du test de Tukey effectué sur les indices de colonisation des bio-indicateurs tomate à JAT 37

* Etude des indices de flétrissement à JAT 48

La **Figure n°15** montre les indices de maladie obtenus à JAT48 pour chaque traitement et chaque modalité de bâchage.

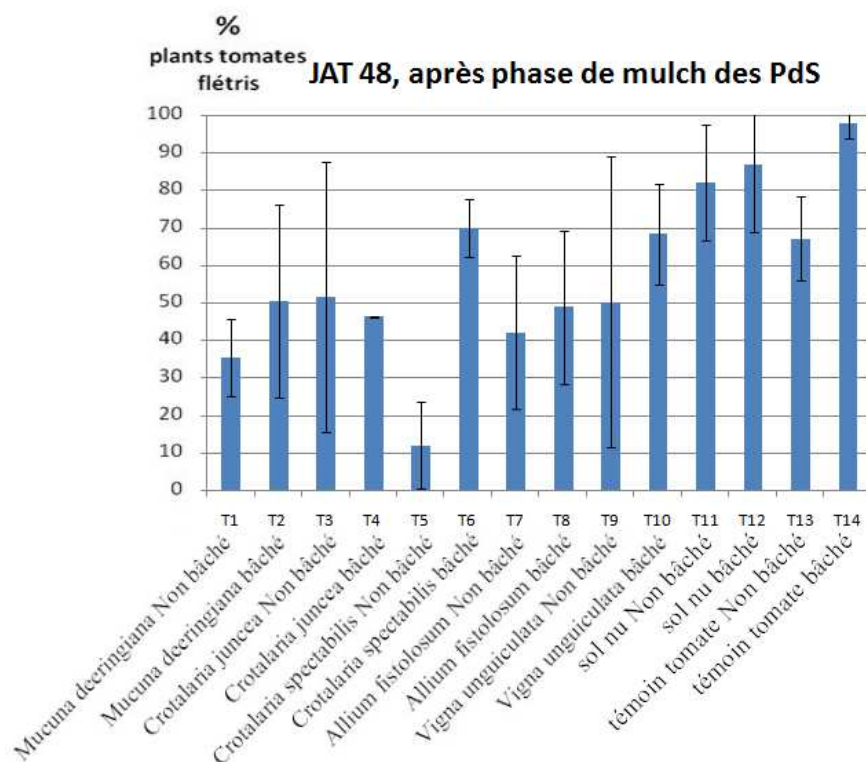


Figure n°15: graphique de flétrissement des bioindicateurs tomate à JAT 48

La **Figure n° 16** présente le résultat de l'ANOVA effectuée sur les indices flétrissements des bioindicateurs tomate à JAT 48.

La p-value avec comme facteur le bloc est supérieure au seuil de 0.05 ; je considère donc que les distributions sont égales, au risque de 5%. Il n'y a donc pas d'effet bloc (les 3 répétitions des mêmes traitements ne sont pas significativement différentes) sur cette période.

La p-value avec comme facteur le traitement est inférieure au seuil de 0.05, je considère donc que les distributions ne sont pas égales, au risque de 5%. Il y a donc un effet des traitements à JAT 48.

```

>
> plot(arcsin~factraitement)
> shapiro.test(residuals(aov(arcsin~factraitement)))

      Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(aov(arcsin ~ factraitement))
W = 0.9811, p-value = 0.7058

>
> at <-aov(arcsin~facbloc)
> summary(at)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
facbloc        2  0.562   0.2810    2.366  0.107
Residuals     39  4.632   0.1188

```

Figure n°16: script et résultat de l'anova qui étudie l'effet bloc sur les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 48

Le test de Tukey présenté en **Figure n°17** indique que tous les traitements sont significativement différents du T14 sauf T13, T12, T11 et T6

Le T5 est significativement différent du T12, T6, T13, T11, T10 et du T14.

Tukey HSD

traitement	p adj
T12-T1	0,0321739
T14-T1	0,0031658
T5-T10	0,0192084
T5-T11	0,0014676
T5-T12	0,0007012
T5-T13	0,022478
T2-T14	0,0191001
T3-T14	0,0198707
T4-T14	0,0111262
T5-T14	0,0000907
T7-T14	0,0064604
T8-T14	0,014558
T9-T14	0,0135896
T6-T5	0,0123996

Figure n°17: résultat du test de Tukey effectué sur les indices de colonisation des bio-indicateurs tomate à JAT 48

Le résultat de l'évaluation de l'effet bâchage est présenté par la **Figure n° 18** et la p-value inférieure à 0.05 nous indique qu'un effet bâche est présent sur les échantillons, au risque de 5%.

```
>
> at <-aov(arcsin~bache*factraitement)
> summary(at)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
bache	1	0.6241	0.6241	10.183	0.003482	**
factraitement	6	2.1597	0.3600	5.874	0.000461	**
bache:factraitement	6	0.6940	0.1157	1.887	0.118268	
Residuals	28	1.7159	0.0613			

```
---
```

Figure n°18: script et résultat de l'ANOVA qui étudie l'effet bâche sur les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 48

D/ Production de biomasse par les plantes de service et teneur en azote minéral du sol

Les rendements en matière sèche des plantes de service après leur phase culturale sont présentés en **Figure n°19**.

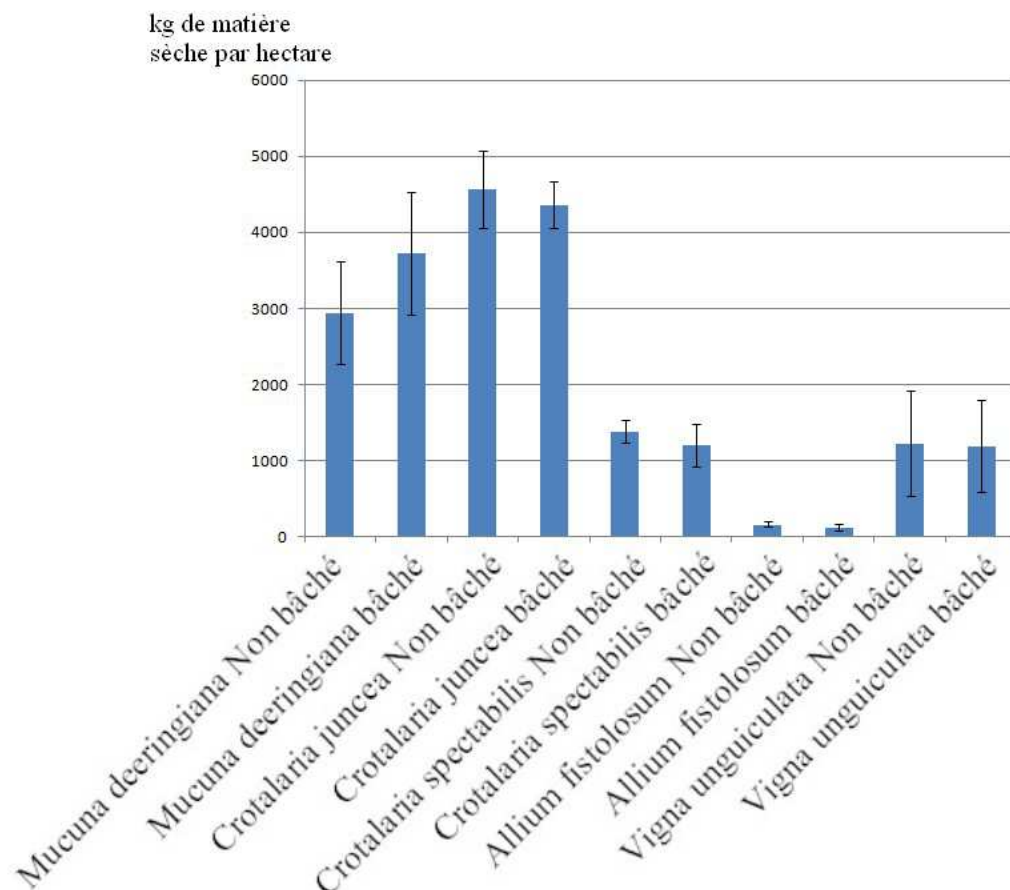


Figure n°19: matière fraîche produite par les différentes plantes de service après leur phase culturale

On retrouve les valeurs obtenues durant la campagne 2011/2012 menée par Félix Mathurin ^[14]

F/ L'Etat biologique du sol via l'analyse des activités enzymatiques

1/ Avant la période de croissance des plantes de service

Les prélèvements de sol effectués avant et après la phase de croissance des plantes de service et après leur phase de mulch ont donné lieu à l'analyse de l'activité de 4 enzymes (**dont l'utilité à été expliquée en partie mat & méthodes ou avant**). L'état biologique du sol peut-être qualifié en fonction de l'activité de ces enzymes.

FDA (Hydrolyse de la fluorescéine diacétate)

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

data: residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9685, p-value = 0.7006

>
> #plot(result~sample)
> #barplot(tapply(result,sample,mean))
> #tapply(result,sample,summary)
>
> summary(aov(result~sample))
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
sample         6  4.674   0.7790   3.757 0.0193 *
Residuals     14  2.902   0.2073
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°20**), et montre, grâce à une p-value de 0,02, qu'au minimum un échantillon est significativement différents des autres. Un test de Tukey est donc effectué pour comparer les traitements deux à deux.

Figure n° 20 : script et résultat de l'anova qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 31

Le résultat du test de Tukey, présenté en Annexe n°I, nous montre qu'il existe trois groupes de traitements. Le T1/T2 a une activité FDA significativement à T9/T10 et que tous les autres couples sont significativement identiques.

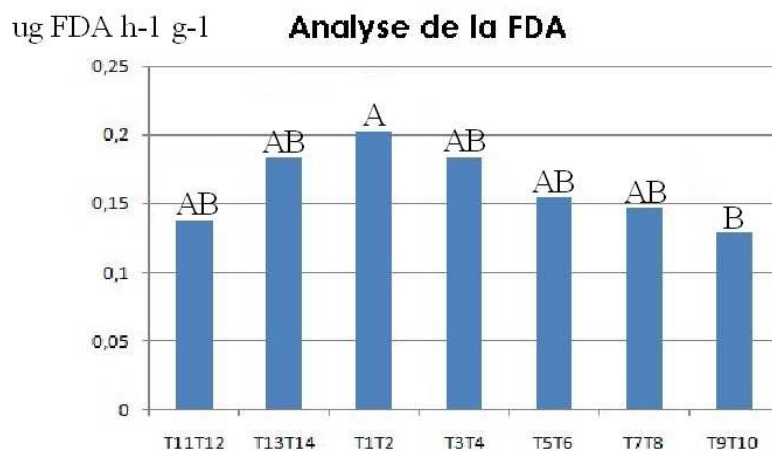


Figure n° 21 : groupes d'appartenance en fonction du test de Tukey effectué sur les analyses de FDA B-Glucosidase

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°22**), et montre que les échantillons ne sont pas significativement différents les uns des autres.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

data: residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9716, p-value = 0.7671

>
> #plot(result~sample)
> #barplot(tapply(result,sample,mean))
> #tapply(result,sample,summary)
>
> summary(aov(result~sample))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sample	6	0.05858	0.009763	0.664	0.68
Residuals	14	0.20600	0.014714		

Figure n° 22 : script et résultat de l'ANOVA qui étudie les résultats de l'analyse de l'activité de la B-glucosidase

Arylsulfatase

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°23**), et montre que les échantillons ne sont pas significativement différents les uns des autres.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

data: residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.925, p-value = 0.1091

>
> #plot(result~sample)
> #barplot(tapply(result,sample,mean))
> #tapply(result,sample,summary)
>
> summary(aov(result~sample))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sample	6	0.0940	0.01567	0.298	0.927
Residuals	14	0.7348	0.05249		

Figure n° 23 : script et résultat de l'anova qui étudie les résultats de l'analyse de l'activité de l'Arylsulfatase

Chitinase

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°24**), et montre que les échantillons ne sont pas significativement différents les uns des autres.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))  
  
      Shapiro-Wilk normality test  
  
data:  residuals(aov(result ~ sample))  
W = 0.9695, p-value = 0.7219  
  
>  
> #plot(result~sample)  
> #barplot(tapply(result, sample, mean))  
> #tapply(result, sample, summary)  
>  
> summary(aov(result~sample))  
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)  
sample         6  0.001924  0.0003206    0.321   0.915  
Residuals     14  0.014000  0.0010000
```

Figure n° 24 : script et résultat de l'anova qui étudie les indices de colonisation des bioindicateurs tomate à JAT 31

2/ Après la phase de croissance des plantes de service

FDA (Hydrolyse de la fluorescéine diacétate)

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°25**), et montre que les échantillons ne sont pas significativement différents les uns des autres.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9764, p-value = 0.866

>
> #plot(result~sample)
> #barplot(tapply(result,sample,mean))
> #tapply(result,sample,summary)
>
> summary(aov(result~sample))
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
sample    6  1.574   0.2624    0.565   0.751
Residuals 14  6.500   0.4643
```

Il apparaît que les différences d'activité enzymatique présentes entre les traitements au temps initial se soient résorbées.

Figure n° 25 : script et résultat de l'anova qui étudie l'activité de la FDA après la phase de croissance des plantes

B-Glucosidase

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9321, p-value = 0.1516

>
> #plot(result~sample)
> #barplot(tapply(result,sample,mean))
> #tapply(result,sample,summary)
>
> summary(aov(result~sample))
      Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
sample    6  0.578  0.09633    7.211 0.00116 **
Residuals 14  0.187  0.01336
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Figure n° 26 : script et résultat de l'anova qui étudie l'activité de la B-Glucosidase après la phase de croissance

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°26**), et montre, grâce à une p-value de 0,00116, qu'au minimum un échantillon est significativement différents des autres. Un test de Tukey est donc effectué pour comparer les traitements deux à deux.

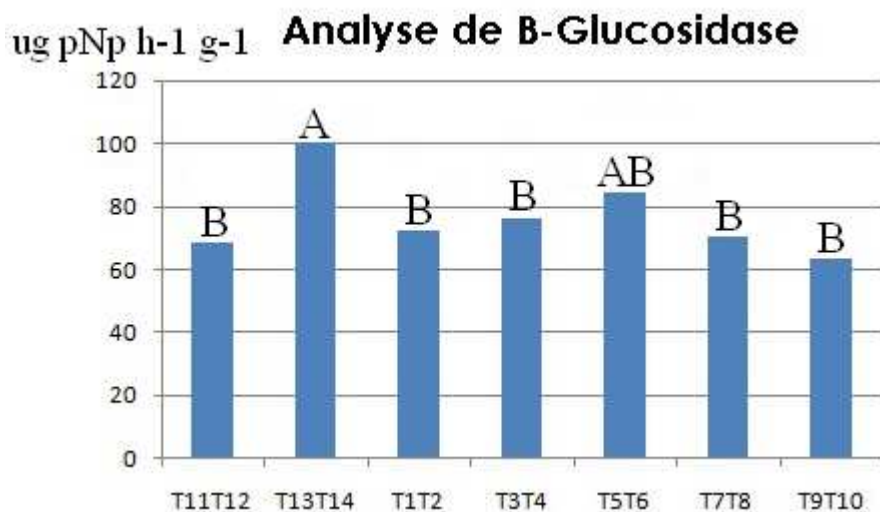


Figure n° 27 : graphique présentant les groupes d'appartenance en fonction des activités en B-glucosidase

Le résultat du test de Tukey, présenté en Annexe n°II, nous montre qu'il existe trois groupes de traitements. Le T13/T14 a une activité FDA supérieure à tous les traitements, sauf le T5/T6, qui appartient aux deux groupes.

Chitinase

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°28**), et montre que les échantillons ne sont pas significativement différents les uns des autres.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

data: residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9558, p-value = 0.4356

>
> #plot(result~sample)
> #barplot(tapply(result,sample,mean))
> #tapply(result,sample,summary)
>
> summary(aov(result~sample))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sample	6	0.01591	0.002651	1.114	0.403
Residuals	14	0.03332	0.002380		

Figure n° 28 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la chitinase

3/ Après la phase de croissance des plantes de service

FDA (Hydrolyse de la fluorescéine diacétate)

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en figure n°29), et montre que les échantillons sont significativement différents les uns des autres, au risque de 5%. Un test de Tukey est donc effectué pour comparer les traitements deux à deux.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9648, p-value = 0.2186

>
> summary(aov(result~sample))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sample	13	0.12085	0.009297	4.142	0.000791 ***
Residuals	28	0.06284	0.002244		

Figure n° 29 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la FDA

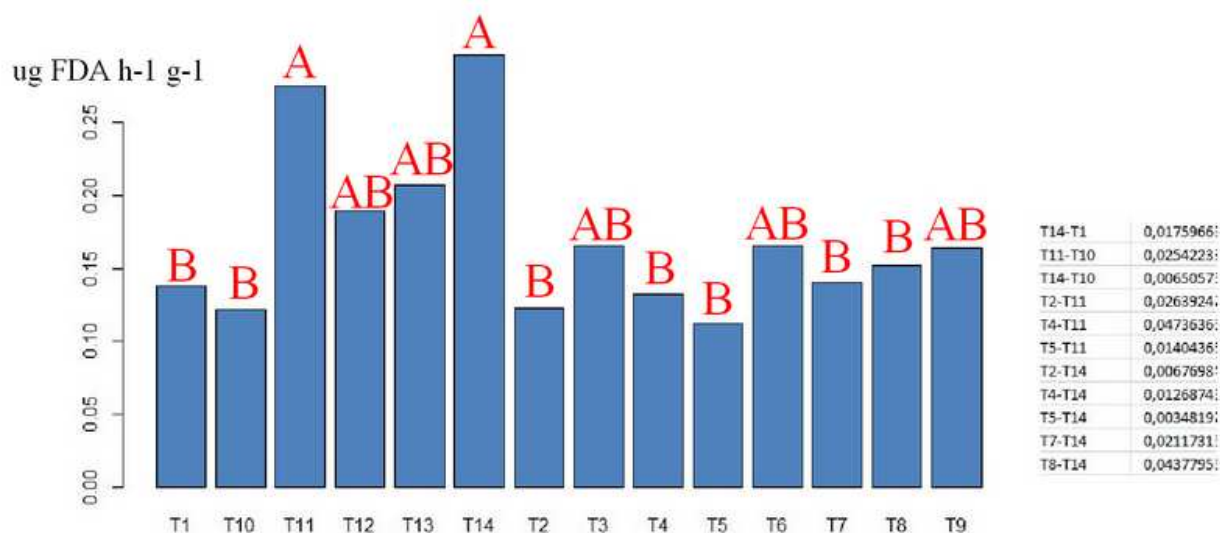


Figure n° 30 : graphique présentant les groupes d'appartenance en fonction des activités en FDA mesurées

B-Glucosidase

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°31**), et montre que les échantillons sont significativement différents les uns des autres, au risque de 5%. Un test de Tukey est donc effectué pour comparer les traitements deux à deux.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

Shapiro-Wilk normality test

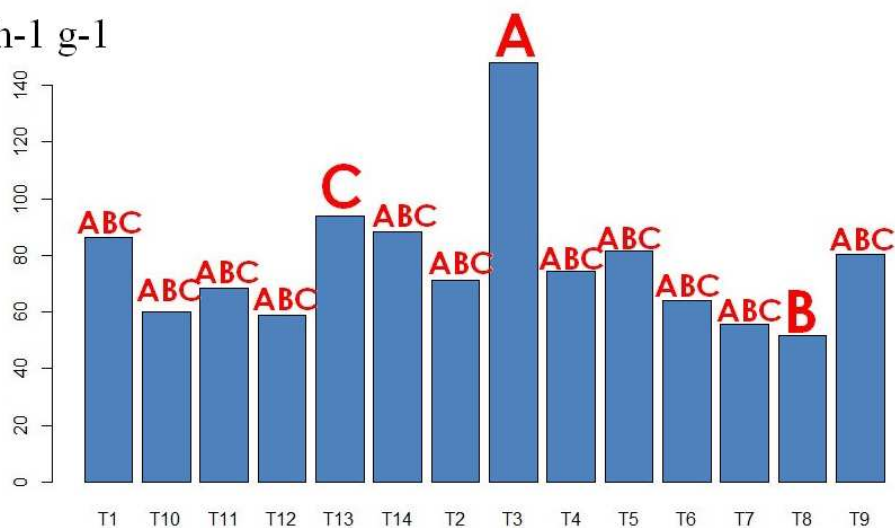
data:  residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9839, p-value = 0.8092

>
> summary(aov(result~sample))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sample	13	22647	1742	8.934	7.83e-07 ***
Residuals	28	5460	195		

Figure n° 31 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la B-glucosidase

ug pNp h⁻¹ g⁻¹



T3-T1	0,000638
T3-T10	1,7E-06
T3-T11	1,09E-05
T3-T12	1,3E-06
T3-T13	0,003566
T8-T13	0,047379
T3-T14	0,000973
T3-T2	2,04E-05
T4-T3	4,34E-05
T5-T3	0,000222
T6-T3	0,000004
T7-T3	6E-07
T8-T3	3E-07
T9-T3	0,000159

Figure n° 32 : graphique présentant les groupes d'appartenance en fonction des activités en B-glucosidase

Chitinase

Comme précédemment, un test de Shapiro a été effectué, suivi d'une ANOVA (présentée en **Figure n°33**), et montre que les échantillons ne sont pas significativement différents les uns des autres, au risque de 5%.

```
> shapiro.test(residuals(aov(result~sample)))

      Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(aov(result ~ sample))
W = 0.9581, p-value = 0.1267

>
> summary(aov(result~sample))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sample	13	595.5	45.81	1.004	0.473
Residuals	28	1277.2	45.61		

Figure n° 33 : script et résultat de l'anova qui étudie les activités de la chitinase

La **Figure n°34** résume les activités enzymatiques (en ug pNp h⁻¹ g⁻¹ ou en ug FDA h⁻¹ g⁻¹) mesurées pour tous les échantillons et toutes les dates.

Avant la phase de culture des PdS				
	FDA	B-glu	arylsulfatase	chitinase
T1/T2	0,20 A	60,96 A	90,39 A	26,20 A
T3/T4	0,18 AB	62,93 A	83,44 A	22,36 A
T5/T6	0,16 AB	58,65 A	93,81 A	25,43 A
T7/T8	0,15 AB	64,17 A	97,49 A	26,62 A
T9/T10	0,13 B	54,93 A	94,01 A	24,71 A
T11/T12	0,14 AB	66,35 A	85,58 A	25,49 A
T13/T14	0,18 AB	64,55 A	92,60 A	25,87 A

Après la phase de culture des PdS			
	FDA	B-glu	chitinase
T1/T2	0,11 A	72,16 B	22,66 A
T3/T4	0,11 A	76,13 B	32,67 A
T5/T6	0,11 A	84,29 AB	23,96 A
T7/T8	0,07 A	70,42 B	23,01 A
T9/T10	0,08 A	63,20 B	27,28 A
T11/T12	0,08 A	68,32 B	23,46 A
T13/T14	0,11 A	100,49 A	31,14 A

Après la phase de mulch des plantes de service			
	FDA	B-glu	chitinase
T1	0,13 B	81,59 ABC	28,13 A
T2	0,14 B	71,27 ABC	24,36 A
T3	0,21 AB	103,26 A	30,96 A
T4	0,14 B	74,52 ABC	37,45 A
T5	0,13 B	75,82 ABC	26,47 A
T6	0,24 AB	70,34 ABC	36,43 A
T7	0,18 B	59,59 ABC	24,14 A
T8	0,18 B	55,82 B	24,25 A
T9	0,22 AB	75,63 ABC	35,05 A
T10	0,14 B	68,40 ABC	24,28 A
T11	0,25 A	69,09 ABC	21,04 A
T12	0,25 AB	67,46 ABC	24,74 A
T13	0,28 AB	94,06 C	24,03 A
T14	0,20 A	98,58 ABC	19,29 A

Les lettres différentes représentent des groupes significativement différents, à lire par colonne et par date

Figure n° 34 : groupes d'appartenance suite aux tests de Tukey effectués sur les activités enzymatiques, à lire par

III/ Interprétation

A/ Effet suppressif des plantes de service sur le flétrissement bactérien de la tomate

Avant la phase de croissance des plantes de service, l'inoculum en *R. solanacearum* était bien présent et la maladie uniformément répartie sur la parcelle expérimentale, puisque les témoins tomate T13 et T14 ont flétri de façon importante (jusqu'à 100%, avec une moyenne de 83%) et sans différence significative entre eux.

Les indices de flétrissement observés en serre après la phase de croissance des plantes de service présentent en revanche des différences. Les traitements témoin tomate présentent des niveaux de flétrissement comparables à ceux obtenus au début de l'étude (72%), alors que les indices de flétrissement des traitements plantes de service vont de 5 à 47% et sont tous significativement différents des témoins tomate.

Le *Mucuna deeringiana* (T1/T2) et le *Vigna unguiculata* cv. 'Ebony' (T9/T10) présentent tous deux des taux de flétrissements de 5% et sont tous deux significativement différents des traitements sol nu (T11/T12) et témoin tomate (T13/T14). Les indices de flétrissement des autres plantes de service ne sont pas différents de ceux du traitement sol nu tandis que *Crotalaria spectabilis* (T5/T6) présente un taux de flétrissement significativement supérieur à celui du traitement sol nu.

Le traitement sol nu (T11/T12) présente un indice de flétrissement faible (9 %) car il a été désherbé durant la période de croissance des plantes de service ; les bactéries du genre *R. solanacearum* n'ont donc pas eu de plantes hôtes à disposition pour se multiplier. Ce traitement sol nu est cependant important car il met en évidence le fait que même avec une période d'interculture de 70 jours sans plante, l'inoculum peut survivre.

Concernant les indices de flétrissement observés au champ après la phase de mulch des plantes de service, tous les traitements plantes de service ont des taux de flétrissement significativement inférieurs à celui du témoin tomate bâché (T14), sauf le traitement *C. spectabilis* en modalité bâchée (T6). Le *Vigna* (T9 et T10) est moins intéressant car à JAT37 comme à JAT48 les taux de flétrissement observés ne sont pas significativement différents des témoins sol nu (T11 et T12) mais sont significativement différents des témoins tomates (T13 et T14).

A JAT 37, l'indice de flétrissement après le précédent *Crotalaria spectabilis* modalité non-bâchée (T5) est significativement inférieur à celui du traitement sol nu non-bâché (T12) et tomate non-bâché (T14). Nous retrouvons ce même résultat à JAT 48.

C. spectabilis est la plante de service pour laquelle le taux de flétrissement final enregistré sur le bioindicateur tomate est le plus bas.

A JAT 48, le taux de flétrissement du traitement *Crotalaria spectabilis* modalité bâchée (T6) n'est pas significativement différent des témoins sol nu et tomates ; en revanche le taux de flétrissement du traitement *Mucuna deeringiana* modalité non bâchée (T1) est significativement inférieur à celui du témoin tomate modalité bâchée et du sol nu modalité bâchée.

Il est intéressant de voir que les traitements ayant montré la meilleure diminution du flétrissement bactérien par rapport au témoin tomate ne sont pas les mêmes en fin de phase culturale et après la phase de mulch (phase de décomposition des plantes de service). Notons tout de même que les résultats d'incidence de maladie après la phase de croissance des plantes de service et après la phase de mulch des plantes de service sont difficilement comparables. En effet, les premiers ont été mesurés en serre après perturbation et transfert du sol en jardinières tandis que les second ont été mesurés au champ. Bien que l'incidence de la maladie sur les traitements témoins tomates aient été identiques (proche de 100% dans les deux cas), les conditions environnementales sont très différentes ; Les populations de *R. solanacearum* ont donc pu réagir de manière différente dans les différentes conditions expérimentales.

La substance active de la plante la plus efficace est ,*C. spectabilis*, est la pyrrolizidine. A Madagascar et en Europe, *Symphytum officinale* est utilisée pour contrôler le flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* (Rahetlah, V.B. ^[15]) ; Cette plante a été choisie pour la pyrrolizidine qu'elle contient ^[16].

Reste que *C. juncea*, autre plante que nous avons testé dans notre étude (T3 et T4), produit également la pyrrolizidine ^[8], mais son effet en tant que plante de service est nettement moins prononcé (50% à JAT 48 contre 12% pour *C. spectabilis*).

Allium fistulosum a un effet suppressif sur la maladie qui peut être exploitable. En effet on observe qu'après une phase de mulch non bâchée, la maladie n'apparaît que très tardivement sur les bioindicateurs tomate (JAT23 contre JAT15 pour les autres traitements). Le début de l'apparition des symptômes sur les bioindicateurs correspond au début de l'enherbement de la

parcelle de Rivière Lézarde, qui pourrait être à l'origine de la propagation de la maladie sur les parcelles d'*Allium*, à cause des adventices hôtes. Une densité de plantation plus importante ou un désherbage plus efficace pourraient permettre d'améliorer les résultats.

B/Impact du bâchage et effet des plantes de service

Le bâchage, technique coûteuse en main d'œuvre et en intrants pour les agriculteurs, ne semble pas participer à la réduction du flétrissement bactérien au cours de notre étude.

En effet, les indices de flétrissement observés au champ après la phase de mulch mettent en évidence une certaine dualité des résultats. En effet, la modalité bâchage a augmenté le flétrissement sur presque tous les traitements, avec un effet maximal et significatif pour les témoins tomates, dont le taux de flétrissement atteint 55% pour la modalité non-bâchée (T13) et 95% pour la modalité bâchée (T14). Mais également un effet significatif sur une plante de service, *C. spectabilis*, pour laquelle le taux de flétrissement atteint 12% en modalité non bâchée contre 72% en modalité bâchée.

Egalement, Peninna Deberdt et Paula Fernandez (com.personelle) ont précédemment mis en évidence une corrélation positive entre le taux de NO_3^- dans le sol et l'expression du flétrissement bactérien chez la tomate. On remarque que les analyses de NO_3^- effectuées sur les échantillons de sol prélevés après la phase de mulch séparent en deux groupes les modalités bâchées et non bâchées parmi tous les traitement. Avec des valeurs inférieures à 5g de NO_3^- par kg de sol sec pour les traitements non-bâchés, nous obtenons des valeurs comprises entre 13 et 19g de NO_3^- par kg de sol sec pour les traitements bâchés.

Cette hausse du taux de NO_3^- peut avoir plusieurs origines:

- Un effet indirect du bâchage qui augmente la température du sol, accélère donc la minéralisation ($\text{NH}_4^+ \Rightarrow \text{NO}_3^-$) par les bactéries. Comme il n'y a pas de plantes pour consommer le NO_3^- produit, il s'accumule.
- Un effet physique direct du bâchage qui limite le lessivage du NO_3^- dans le sol.

Les mesures d'activités enzymatiques ne permettent pas de confirmer la première hypothèse. En effet une minéralisation plus intense de la part des bactéries minéralisantes devrait conduire à une augmentation de l'activité de la B-glucosidase (qui est une enzyme dont l'activité est corrélée avec celle des microorganismes du sol intervenant dans la dégradation de la matière organique).

Cependant l'activité de la B-glucosidase n'est pas significativement différente entre les modalités bâchées et non-bâchées.

Quelle qu'en soit la cause, le bâchage n'est pas une pratique agricole recommandable pour contrôler le flétrissement bactérien.

Conclusions et perspectives

La plante de service ayant exprimé le plus fort effet assainissant est *Crotalaria spectabilis*, après une phase de culture suivie d'une phase de mulch., en modalité non bâchée.

Allium fistulosum, potentiellement très intéressant par le fait qu'il est prouvé qu'il n'héberge pas la bactérie *R. solanacearum*, n'a pas donné d'aussi bon résultats que *C. spectabilis* mais nous constatons qu'il a permis, après une phase de mulch, de retarder l'expression de la maladie sur les bioindicateurs tomate en plein champ. Il serait donc intéressant de l'intégrer à une rotation et/ou association culturale avec *C. spectabilis*.

La phase de mulch apparaissant importante pour l'obtention d'une bonne suppressivité de la maladie avec *C. spectabilis*, *A. fistulosum* pourrait être cultivé en association avec la tomate, après une phase de culture suivie d'une phase de mulch de *C. spectabilis*.

Mucuna deeringiana a exprimé également un effet suppressif sur la maladie non significativement différent de celui de *A. fistulosum*, mais celui-ci n'est que peu valorisable, alors que *A. fistulosum* a un intérêt économique pour l'agriculteur.

Il serait intéressant de mesurer, à l'aide de bioindicateur tomate, l'effet de l'apport exogène de mulch des traitements à retenir tels que *C. spectabilis* et *Allium fistulosum*. Ceci permettrait de caractériser son importance bien plus précisément que lors de cette étude, qui induit un biais à cause du fait d'essais menés séparément en serre avant le mulch sur le terrain après le mulch..

La durabilité de l'effet suppressif des plantes de services sur la maladie serait également intéressante à étudier.

Bibliographie

[1] Auteur inconnu, 2011.

Lutter contre une pénurie de tomates en Martinique

Site internet: <http://agriculture.gouv.fr/lutter-contre-une-penurie-de>

[2] Lebeau, 2010.

Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum* : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine.

Thèse, Université de la Réunion. 178 pages

[3] Fernandez *et al.*, 2012.

Des plantes assainissantes candidates pour réduire le flétrissement bactérien de la tomate dans les conditions de la Martinique.

Les cahiers du PRAM n°11, p. 27-30

[4] Deberdt, P., Perrin, B., Coranson-beaudu, R., Duick, P., and Wicker, E. 2012.

Effect of *Allium fistulosum* Extract on *Ralstonia solanacearum* Populations and Tomato Bacterial Wilt. Plant Disease 96:687-692.

[5] Wu *et al.*, 2012.

Synthesis and antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* for novel hydrazone derivatives containing a pyridine moiety.

Chemistry Central Journal 2012

<http://journal.chemistrycentral.com/content/6/1/28>

[6] Lwin and Ranamukhaarachchi, 2006.

Development of Biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations.

International journal of agriculture & biology, pages 657 à 660

http://fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_8_NO_5/21.pdf

[7] Charles *et al.*, 2012

Effets biotiques des cultures intermédiaires sur les adventices, la microflore et la faune.

[8] Quaranta, 2009

Effet des plantes de service sur les bioagresseurs des cultures: Etude bibliographique sur les plantes utilisées dans les systèmes de culture sur couverture végétale à Madagascar

Cirad, Unité de recherche SCRID, département PERSYST, 90 pages.

- [9] Villeneuve et Lepaumier, 2000
Biodésinfection des sols, pages 42 à 44.
Ctifl n°161, Mai 2000
- [10] Demuysere, 2011
Développement d'un indice mesurant la stabilité enzymatique des sols pour évaluer l'impact d'une contamination organique complexe sur la qualité de sols dans un contexte de remédiation.
Université de Montréal, département de génie chimique, rapport de maîtrise des sciences appliquées.
- [11] Rémi Asensio, 2013
Synthèse bibliographique: les activités enzymatiques indicatrices de la santé du sol.
- [12] J. R. Miesel *et al.*, 2010
Soil nitrogen mineralization and enzymatic activities in fire and fire surrogate treatments in California
- [13] Acosta-Martinez *et al.*, 2006
Enzyme activities as affected by soil properties and land use in tropical watershed.
Applied Soil Ecology, pages 35 à 45.
- [14] Mathurin, 2012
Etude du potentiel assainissant de plantes de services contre le flétrissement bactérien de la tomate (*R. solanacearum*) en conditions de plein champ.
- [15] Rahetlah, V.B., 2002.
Etudes des effets des exudates rauviaires de *Symphytum officinale uplandicum* (grande consoude) contre le flétrissement bactérien de *Lycopersicum esculentum* Mill. dû à *Ralstonia solanacearum*.
Mémoire DEA de Biochimie: Faculté des sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar. 67 pages.
- [16]. Schmelzer and Gurib-Fakim, 2008
Medicinal plants 1, 775 pages
http://books.google.com/books?id=7FJqgQ3_tnUC&pg=PA584&lpg=PA584&dq=pyrrolizidine+rалstonia&source=bl&ots=QtMvrFPdR0&sig=WWBM3uGOdIT3HL2O-sjUdYF7BYs&hl=fr&sa=X&ei=krU4Uez0FJT69gTg5oCACw&ved=0CDUQ6AEwAQ#v=onepage&q=pyrrolizidine%20ralstonia&f=false

ANNEXES

Annexe I : résultat du test de Tukey effectué sur les taux de flétrissements à JAT31 pour déterminer les groupes d'appartenance

\$factraitement	diff	lwr	upr	p adj
T11/T12-T1/T2	0.174605662	0.02148249	0.327728831	0.0141565
T13/T14-T1/T2	0.590091055	0.43696789	0.743214224	0.0000000
T3/T4-T1/T2	0.199226336	0.04610317	0.352349505	0.0026708
T5/T6-T1/T2	0.423957905	0.27083474	0.577081074	0.0000000
T7/T8-T1/T2	0.179089578	0.02596641	0.332212748	0.0106262
T9/T10-T1/T2	0.032538086	-0.12058508	0.185661255	0.9956943
T13/T14-T11/T12	0.415485393	0.26236222	0.568608562	0.0000000
T3/T4-T11/T12	0.024620674	-0.12850250	0.177743843	0.9990979
T5/T6-T11/T12	0.249352244	0.09622907	0.402475413	0.0000475
T7/T8-T11/T12	0.004483917	-0.14863925	0.157607086	1.0000000
T9/T10-T11/T12	-0.142067576	-0.29519074	0.011055593	0.0886093
T3/T4-T13/T14	-0.390864719	-0.54398789	-0.237741550	0.0000000
T5/T6-T13/T14	-0.166133149	-0.31925632	-0.013009980	0.0238202
T7/T8-T13/T14	-0.411001476	-0.56412465	-0.257878307	0.0000000
T9/T10-T13/T14	-0.557552969	-0.71067614	-0.404429800	0.0000000
T5/T6-T3/T4	0.224731570	0.07160840	0.377854739	0.0003796
T7/T8-T3/T4	-0.020136757	-0.17325993	0.132986412	0.9997164
T9/T10-T3/T4	-0.166688250	-0.31981142	-0.013565081	0.0230421
T7/T8-T5/T6	-0.244868327	-0.39799150	-0.091745158	0.0000703
T9/T10-T5/T6	-0.391419820	-0.54454299	-0.238296650	0.0000000
T9/T10-T7/T8	-0.146551493	-0.29967466	0.006571676	0.0707241

Annexe II : résultat du test de Tukey effectué sur les activités enzymatiques de la FDA avant la phase de croissance des PdS pour déterminer les groupes d'appartenance

```
> TukeyHSD(aov(resultd1~traitement),"traitement")
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = resultd1 ~ traitement)

$traitement
              diff          lwr          upr          p adj
T13T14-T11T12  0.045407293 -0.022425693  0.113240279  0.3145390
T1T2-T11T12    0.064225557 -0.003607429  0.132058543  0.0689016
T3T4-T11T12    0.044744127 -0.023088859  0.112577113  0.3293586
T5T6-T11T12    0.017499264 -0.050333722  0.085332250  0.9698115
T7T8-T11T12    0.009536483 -0.058296503  0.077369469  0.9987524
T9T10-T11T12  -0.009358336 -0.077191322  0.058474650  0.9988775
T1T2-T13T14    0.018818264 -0.049014722  0.086651250  0.9575693
T3T4-T13T14   -0.000663166 -0.068496152  0.067169820  1.0000000
T5T6-T13T14   -0.027908029 -0.095741015  0.039924957  0.7909496
T7T8-T13T14   -0.035870810 -0.103703796  0.031962176  0.5650338
T9T10-T13T14  -0.054765629 -0.122598615  0.013067357  0.1541808
T3T4-T1T2     -0.019481430 -0.087314416  0.048351556  0.9503111
T5T6-T1T2     -0.046726292 -0.114559278  0.021106694  0.2864411
T7T8-T1T2     -0.054689073 -0.122522059  0.013143913  0.1551451
T9T10-T1T2    -0.073583893 -0.141416879 -0.005750907  0.0297229
T5T6-T3T4     -0.027244863 -0.095077849  0.040588123  0.8075907
T7T8-T3T4     -0.035207644 -0.103040630  0.032625342  0.5844848
T9T10-T3T4    -0.054102463 -0.121935449  0.013730523  0.1627068
T7T8-T5T6     -0.007962781 -0.075795767  0.059870205  0.9995503
T9T10-T5T6    -0.026857601 -0.094690587  0.040975385  0.8170424
T9T10-T7T8    -0.018894820 -0.086727806  0.048938166  0.9567700
```


Annexe III : résultat du test de Tukey effectué sur les activités enzymatiques de la B-glucosidase après la phase de croissance des PdS pour déterminer les groupes d'appartenance

```
> TukeyHSD(aov(resultd2~traitement),"traitement")
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = resultd2 ~ traitement)

$traitement
              diff            lwr            upr            p adj
T13T14-T11T12 32.171004      9.740889    54.601119    0.0034122
T1T2-T11T12   3.840982    -18.589134    26.271097    0.9963019
T3T4-T11T12   7.803596    -14.626519    30.233711    0.8875728
T5T6-T11T12  15.962563     -6.467552    38.392679    0.2558328
T7T8-T11T12   2.096388    -20.333727    24.526504    0.9998792
T9T10-T11T12  -5.121529    -27.551644    17.308586    0.9833761
T1T2-T13T14  -28.330022    -50.760138    -5.899907    0.0098160
T3T4-T13T14  -24.367408    -46.797523    -1.937293    0.0294322
T5T6-T13T14  -16.208441    -38.638556     6.221674    0.2420300
T7T8-T13T14  -30.074616    -52.504731    -7.644501    0.0060603
T9T10-T13T14 -37.292533    -59.722649   -14.862418    0.0008701
T3T4-T1T2     3.962614    -18.467501    26.392730    0.9956247
T5T6-T1T2    12.121582    -10.308534    34.551697    0.5420882
T7T8-T1T2    -1.744593    -24.174709    20.685522    0.9999587
T9T10-T1T2   -8.962511    -31.392626    13.467604    0.8110433
T5T6-T3T4     8.158967    -14.271148    30.589083    0.8662082
T7T8-T3T4    -5.707208    -28.137323    16.722907    0.9717364
T9T10-T3T4   -12.925125    -35.355241     9.504990    0.4729639
T7T8-T5T6   -13.866175    -36.296290     8.563940    0.3970943
T9T10-T5T6  -21.084092    -43.514208     1.346023    0.0717675
T9T10-T7T8    -7.217917    -29.648033    15.212198    0.9183306
```

